



原花青素舒张家兔离体肺动脉的研究

张团笑¹, 牛彩琴^{2*}, 蓝海涛¹, 刘红¹, 敬华娥¹

(1. 川北医学院 生理学教研室, 四川 南充 637007;

2. 川北医学院 中西医临床医学系, 四川 南充 637007)

[摘要] 目的:研究葡萄籽提取物原花青素(PC)对家兔离体肺动脉血管的舒张作用及机制。方法:采用家兔离体肺动脉平滑肌标本,以去甲肾上腺素(NA)预收缩后,给予PC(0.625,1.25,2.5 mg·L⁻¹),观察其舒张血管的量效关系;并分为对照组、PC组、PC+吲哚美辛(1×10⁻⁵ mol·L⁻¹)、PC+普萘洛尔(1×10⁻⁵ mol·L⁻¹)、PC+左旋硝基精氨酸(1×10⁻⁴ mol·L⁻¹)、PC+甲烯蓝(1×10⁻⁵ mol·L⁻¹)和PC+去内皮细胞7组,探讨PC舒张血管的机制;用PC(20 mg·L⁻¹)温育标本后,观察PC对NA(1×10⁻⁸~1×10⁻⁵ mol·L⁻¹),KCl(6.3~100 mmol·L⁻¹)和CaCl₂(1×10⁻⁵~1×10⁻² mol·L⁻¹)量效曲线的影响。结果:PC能明显舒张肺动脉血管,并有量效关系($r=0.69, P<0.01$);去除血管内皮、L-NNA或MB可抑制PC的舒张作用,但吲哚美辛和普萘洛尔无影响;PC能压低NA,KCl和CaCl₂的量效收缩曲线,三者的pD₂分别由对照的(7.57±2.41),(1.74±1.19),(3.72±1.88)降低为(6.47±1.42),(1.07±1.12),(3.17±1.55);PC也能抑制NA引起的第I时相收缩,对CaCl₂引起的第II时相收缩无影响。结论:PC舒张肺动脉的作用是内皮依赖性,且与NO/cGMP介导有关;也可能是拮抗ROC和PDC通道,降低胞浆Ca²⁺而舒张血管。

[关键词] 原花青素;肺动脉环;内皮细胞;Ca²⁺

原花青素(procyanidins,PC)是广泛存在于植物界中的一类多酚化合物,由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成。它在葡萄属植物种子中含量很高,葡萄类产品如红葡萄酒富含PC,有报道PC能降低冠心病、高血压等心血管疾病的发生^[1],尽管如此,常规应用葡萄酒预防心血管疾病还存在很多问题。为探讨PC对心血管疾病的影响,采用家兔离体肺动脉环恒温灌流法,观察PC对去甲肾上腺素(noradrenaline,NA)、KCl预收缩血管张力的影响,并探讨其作用机制,为PC进入临床的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级健康家兔12只,体重2.5~3.0 kg,雌雄不拘,由兰州生物制品研究所提供,合格证号医动字第14-004号。

1.2 药物与试剂

原花青素购自天津市尖峰天然产物研究开发

公司,批号20020930;多酚≥95.6%,双蒸水配制成1.25,2.5,5.0 g·L⁻¹备用。乙酰胆碱acetylcholine(ACh)和普萘洛尔propranolol(Prop)均为北京第二制药厂产品;左旋硝基精氨酸N^ω-nitro-L-arginine(L-NNA)和吲哚美辛Indomethacin(Indo)均为Sigma产品;甲烯蓝methylene blue(MB)为Merc产品;无Ca²⁺Krebs-Henseleit(K-H)液用0.25 mmol·L⁻¹EDTA代替CaCl₂;其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

离体恒温灌流肌槽(兰州大学化学系玻璃仪器厂);IBM电脑,内置Biopac410(BL-410)智能型生物信号处理系统(成都泰盟电子有限公司);张力传感器(JH-2,中国北京航天医学工程研究所)。

2 方法

2.1 标本制备

健康家兔12只,猛击头致昏后,迅速取出肺动脉,放置于盛有K-H液培养皿中,并持续通入95%O₂和5%CO₂混合气体,剔除结缔组织后制成长2.5~3.0 mm动脉环^[2],置于37℃恒温的灌流肌槽中,持续通有95%O₂和5%CO₂混合气体,经张力换能器将其张力变化输入电脑,用BL-410系统记录实验数据,给予2.0 g的前负荷。每20 min更换1次

[收稿日期] 2009-07-03

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(08ZA109)

[通信作者] *牛彩琴, Tel: (0817) 2242262, E-mail: niucaiqin@126.com

K-H液(37℃),温育平衡1.5~2.0h。加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh后若血管舒张大于60%^[3],视为内皮完整,否则为去内皮的。

2.2 分组及处理

2.2.1 PC对NA预收缩血管张力的影响

记录静息动脉环张力后,用KCl $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激达峰值,然后用K-H液冲洗,重复3次,以诱发血管环的最大收缩幅度。待血管环重新稳定后,用 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NA收缩至最大值,以此为100%效应。向浴槽中累积加入0.625,1.25和2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,记录PC的量效曲线,计算其舒张率(%);并以等量生理盐水(NS)和 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh作为对照。冲洗后在不同的浴槽中分别加入 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-NNA, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MB, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Indo, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Prop温育15min或去除内皮细胞后,加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NA收缩至最大,再累积加入PC观察动脉环的变化。

2.2.2 PC对NA,KCl和CaCl₂量效曲线的影响

在去除内皮细胞的情况下,向浴槽分别累积加入NA($1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),KCl($6.3 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)或CaCl₂($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后,测量并计算其收缩率(%),此为对照组;冲洗后加入PC($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)温育15min后,再做NA,KCl和CaCl₂的量效曲线,方法同对照组。

2.2.3 PC对NA和CaCl₂双时相曲线的影响

将标本置于无Ca²⁺ K-H液的浴槽中温育30min后,加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NA收缩至最大值,再加入 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂描记最大反应,记录其张力(g),此为对照组;冲洗后向浴槽中加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PC温育15min后,再重复上述方法。

2.3 观测指标

血管舒张率(%) = (正常效应值 - 药物效应

值)/正常效应值;血管收缩率(%) = (效应值 - 前负荷值)/(最大效应值 - 前负荷值);血管收缩张力(g) = 效应值 - 前负荷值;亲和力指数(pD_2) = $-\log K_D = \log(1/K_D)$ 。

2.4 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行方差分析或t检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 PC对NA预收缩血管张力的影响

PC可显著舒张内皮完整的肺动脉环,并有剂量依赖关系($r = 0.69, P < 0.01$);且 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PC(69.68 ± 10.67)%与 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACh(65.23 ± 10.88)%的舒张作用相似。用L-NNA,MB温育或去除内皮细胞后,PC舒张血管的作用明显减弱;但Indo和Prop对PC的舒张作用无影响(表1)。

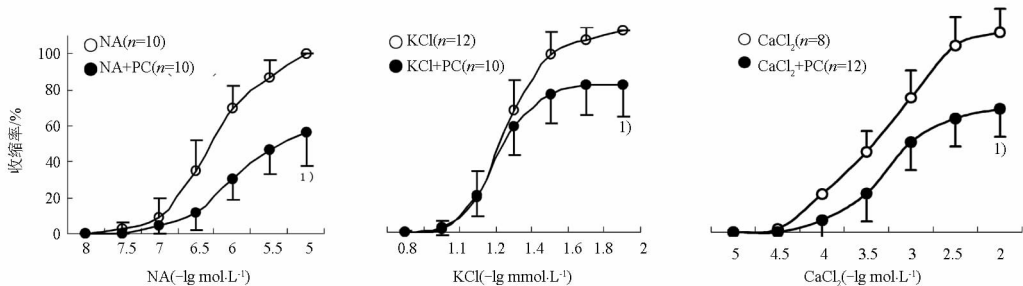
表1 拮抗剂对PC舒张血管作用的影响($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	PC/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
		0.625	1.25	2.50
NS	8	4.65 ± 2.19	7.21 ± 3.06	12.54 ± 3.83
PC	10	14.01 ± 7.1 ¹⁾	56.84 ± 13.52 ¹⁾	69.68 ± 10.67 ¹⁾
PC + Indo	8	13.45 ± 6.90	46.93 ± 17.15	62.78 ± 14.44
PC + Prop	8	8.59 ± 4.35	40.99 ± 14.29	68.55 ± 12.23
PC + Denud	8	4.22 ± 1.09 ²⁾	9.50 ± 2.27 ²⁾	12.79 ± 6.08 ²⁾
PC + L-NNA	8	3.20 ± 2.40 ²⁾	8.17 ± 3.47 ²⁾	14.73 ± 6.04 ²⁾
PC + MB	8	1.85 ± 2.61 ²⁾	9.18 ± 3.88 ²⁾	12.25 ± 4.00 ²⁾

注:与NS比较¹⁾ $P < 0.01$;与PC相比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 PC对NA,KCl和CaCl₂量效曲线的影响

PC能压低NA,KCl和CaCl₂的量效收缩曲线,其最大值分别降为(55.94 ± 18.32)%, (73.28 ± 15.93)%, (61.75 ± 9.81)%, $n = 10, P < 0.01$;且其 pD_2 分别由对照的(7.57 ± 2.41), (1.74 ± 1.19), (3.72 ± 1.88)降为(6.47 ± 1.42), (1.07 ± 1.12), (3.17 ± 1.55)(图1)。



与对照组(NS)比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

图1 PC对NA,KCl和CaCl₂量效曲线的影响



3.3 PC对NA和CaCl₂双时相曲线的影响

PC能明显抑制无钙液中NA引起的第I时相收缩[对照组(2.48±0.24)g,PC温育组(1.60±0.16)g,*n*=10,*P*<0.01],而对CaCl₂诱发的第II时相收缩无影响[对照组(1.52±0.14)g,PC温育组(1.20±0.11)g,*n*=10]。

4 讨论

Preuss H G等^[4]认为PC能降低大鼠因年龄增加而升高的收缩压。在血管内皮完好的情况下,PC与ACh相似,可舒张NA预收缩的动脉环,并有浓度依赖性。血管内皮细胞生成EDRF等^[5-6]即NO,通过可溶性鸟苷酸环化酶受体激活血管平滑肌内的鸟苷酸环化酶,使cGMP浓度升高,引起胞浆内Ca²⁺的降低而舒张血管^[7]。用NOS抑制剂L-NNA和鸟苷酸环化酶抑制剂MB或去除内皮细胞后,发现PC舒张血管的作用明显减弱,说明其舒张血管效应是内皮依赖性的,且与NO/cGMP介导途径有关。

血管内皮细胞使胞内cAMP含量增加而舒张血管,通过环氧酶抑制剂吲哚美辛温育动脉环后,PC舒张血管的作用无明显改变,说明PC舒张血管作用与前列腺素无关。血管平滑肌细胞的β肾上腺素能受体也参与血管舒张,实验中用β肾上腺素能受体阻断剂普萘洛尔温育后,发现PC舒张血管环的作用与β肾上腺素能受体也无关。

胞浆中游离Ca²⁺是引起平滑肌收缩的关键物质。NA和高K⁺分别通过受体依赖性钙通道(ROC)和电压依赖性钙通道(PDC),使细胞外Ca²⁺内流和肌浆网Ca²⁺释放增加,从而升高胞浆中Ca²⁺,引起血管收缩。PC能使NA的量效曲线右移;也能抑制无钙液中NA诱发的第I时相收缩(依内钙性收缩),说明PC能非竞争性的拮抗ROC,减少IP₃的生成,抑制肌浆网Ca²⁺的释放,降低胞内Ca²⁺而使血管舒张。

细胞外K⁺升高,使钾通道受到抑制^[8],引起细胞膜去极化,从而使电压依赖性的钙通道开放,细胞外Ca²⁺内流,导致平滑肌收缩。本实验通过PC温育无内皮的血管环后,抑制了KCl和CaCl₂的量效收缩曲线;说明PC能非竞争性的拮抗电压依赖性的钙通道(PDC),减少细胞外Ca²⁺内流而使血管舒张。Kim等^[9]从山楂中提取的PC通过四乙铵敏感性的K⁺通道,缓解离体大鼠血管的紧张性。与本

实验的结果有所不同,可能与提取PC的原料以及所用的实验动物和条件不同有关。但又有报道^[10-12]葡萄籽原花青素与维拉帕米相似可能与其阻滞钙内流,减轻细胞内钙超载对心肌的损伤,尽管是对心肌的研究,但提示PC有拮抗钙通道,降低细胞内Ca²⁺的作用。至于心肌细胞膜的钙通道与血管平滑肌细胞膜的钙通道是否一致,PC抑制的钙通道是否为同一类通道,其详细机制还有待于进一步的研究。

本实验发现,PC可引起肺动脉血管舒张,可能是内皮依赖性,且与NO/cGMP介导有关;也可能是通过拮抗ROC和PDC通道,抑制Ca²⁺内流和释放,降低细胞内Ca²⁺引起血管舒张。

[参考文献]

- [1] Nuttall S L, Kendall M J, Bombardelli E, et al. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect[J]. Clin Pharm Ther, 1998, 23(5):358.
- [2] 张团笑,牛彩琴,胡建民,等.原花青素舒张家兔主动脉和降低动脉血压的研究[J].中国中药杂志,2008,33(14):1720.
- [3] Nyhan D, Gaine S, Hales M, et al. Pulmonary vascular endothelial responses are differentially modulated after cardiopulmonary bypass[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 34(3):518.
- [4] Preuss H G. Chromium, Zinc, and Grape seed extract (Flavonoids) can overcome age-related increases in SPB normotensive rats[J]. J Am Coll Nutr, 1997, 16(5):43.
- [5] Shan L M, Wang H. Pharmacological characteristics of the endothelial target for acetylcholine induced vascular relaxation[J]. Life Sci, 2002, 70(11):1285.
- [6] Feletou M, Vanhoutte P M. The alternative: EDHF[J]. Mol Cell Cardiol, 1999, 31(1):15.
- [7] Qi Y M, Yang D J, Duan X, et al. Endomorphins inhibit contractile responses of rat thoracic aorta rings induced by phenylephrine and angiotensin II *in vitro*[J]. 中国药理学报, 2002, 23(1):40.
- [8] 姜雨鸽,汪海.血管平滑肌钾通道及其调节因素[J].中国药理学通报,2002,8(5):494.
- [9] Kim S H, Kang K W, Kim K W, et al. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta[J]. Life Sci, 2000, 67(2):121.
- [10] 汪晨净,高明堂,时小燕.原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2003,(2):175.
- [11] 张小郁,李文广,高明堂.葡萄籽中原花青素对心肌细胞的保护作用[J].中药药理与临床,2001,17(6):14.
- [12] 凌智群,谢笔钧,江涛.莲房原花青素对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J].中国药理学通报,2001,7(6):687.



Vasorelaxant effects of procyanidins on rabbit pulmonic ring *in vitro*

ZHANG Tuanxiao¹, NIU Caiqin^{2*}, LAN Haitao¹, LIU Hong¹, JING Huae¹

(1. Department of Physiology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China;

2. Department of Clinical in Chinese and Western Medicine, Nanchong 637007, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the vasorelaxant effect of procyanidin (PC) extracted from grape seeds on rabbit thoracic pulmonic rings *in vitro*. **Method:** Rabbits thoracic pulmonic rings were isolated, pre-contracted with noradrenalin (NA) and their responses to different concentrations of PC were investigated. The effects of endothelium and different signaling pathway inhibitors on PC-induced relaxation, including nitric oxide synthase inhibitor *N*^ω-nitro-*L*-arginine (*L*-NNA), methylene blue (MB), prostaglandin synthase inhibitor indomethacin (Indo) and blockage of the adrenergic β -receptor propranolol (Prop), were also assessed. **Result:** PC change the resting tension of rabbit's pulmonic rings but caused an obvious dose-dependent relaxation in $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NA precontracted pulmonic rings ($r = 0.69$, $P < 0.01$). The relaxant effect of PC was significantly reduced by removal of endothelium or by treatment with either $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *L*-NNA or $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MB, but not by treatment with prostaglandin synthase inhibitor or blockage of the adrenergic β -receptor. In addition, PC ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dropped the dose-effect curves of NA, KCl and respectively on pulmonic rings denuded endothelium. PC can also inhibit the vasoconstriction caused by NA in the first phase, but has no impact on the constriction induced by CaCl_2 in the second phase. **Conclusion:** PC has an endothelium-dependent vasorelaxation on isolated rabbit's pulmonic rings, which is possibly mediated by nitric oxide (NO) pathways and blockage of receptor operated and voltage dependent calcium channels.

[**Key words**] procyanidin; pulmonic ring; endothelium cell; calcium channel

[责任编辑 张宁宁]